

## IMPROVEMENT IN EFFICIENCY OF GENE TRANSFER TO PLANT CELL

**Publication number:** JP2000342256

**Publication date:** 2000-12-12

**Inventor:** HIEI YOSHIHIRO; KASAOKA KEISUKE; ISHIDA YUJI

**Applicant:** JAPAN TOBACCO INC

**Classification:**


- international: **C12N15/09; A01H1/00; C12N5/10; C12N15/82; C12N15/84; C12N15/09; A01H1/00; C12N5/10; C12N15/82; C12N15/84; (IPC1-7): C12N5/10; C12N15/09; A01H1/00**

- European: **C12N15/82A; C12N15/82A4B**

**Application number:** JP19990158025 19990604

**Priority number(s):** JP19990158025 19990604; WO2000JP05213 20000803

**Also published as:**

 WO0212520 (A1)

**Report a data error here**

### Abstract of JP2000342256

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To improve the efficiency of gene transfer to a plant cell simply carried out through a bacterium of the genus *Agrobacterium* without damaging a tissue, to perform transformation and to better a breed by centrifuging a plant cell or a plant tissue. **SOLUTION:** A plant cell or a plant tissue of rice plant, maize, etc., is centrifuged at 100-250,000 G, preferably 500-200,000 G, more preferably 1,000-150,000 G centrifugal acceleration for 1 second to 4 hours, preferably for 5 minutes to 2 hours to improve the efficiency of gene transfer to a plant cell carried out through a bacterium of the genus *Agrobacterium*. Preferably the plant cell or plant tissue is derived from an angiosperm, a monocotyledon or a gramineous plant. Preferably after the plant cell or plant tissue is centrifuged, a gene transfer treatment is performed.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-342256

(P2000-342256A)

(43) 公開日 平成12年12月12日 (2000. 12. 12)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコ-ト* (参考)
C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 15/00	A 2 B 0 3 0
A 0 1 H 1/00		A 0 1 H 1/00	A 4 B 0 2 4
// C 1 2 N 5/10		C 1 2 N 5/00	C 4 B 0 6 5

審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願平11-158025	(71) 出願人	000004569 日本たばこ産業株式会社 東京都港区虎ノ門二丁目2番1号
(22) 出願日	平成11年6月4日 (1999. 6. 4)	(72) 発明者	樋江井 祐弘 静岡県磐田郡豊田町東原700番地 日本た ばこ産業株式会社遺伝育種研究所内
		(72) 発明者	笠岡 啓介 静岡県磐田郡豊田町東原700番地 日本た ばこ産業株式会社遺伝育種研究所内
		(74) 代理人	100088546 弁理士 谷川 英次郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法

(57) 【要約】

【課題】 従来のアグロバクテリウム法による遺伝子導入方法よりも高い効率で組織を付傷することなく簡便に遺伝子導入を行うことができる、植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法を提供すること。

【解決手段】 植物細胞又は植物組織を遠心処理することを伴う、アグロバクテリウム属細菌を介して行われる植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法を提供した。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 植物細胞又は植物組織を遠心処理することを伴う、アグロバクテリウム属細菌を介して行われる植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法。

【請求項2】 植物細胞又は植物組織を遠心処理した後、遺伝子導入処理を行う請求項1記載の方法。

【請求項3】 遠心処理が100G～25万Gの遠心加速度の範囲で行われる請求項1又は2記載の方法。

【請求項4】 遠心処理が500G～20万Gの遠心加速度の範囲で行われる請求項3記載の方法。

【請求項5】 遠心処理が1000G～15万Gの遠心加速度の範囲で行われる請求項4記載の方法。

【請求項6】 遠心処理が1秒間～4時間の範囲で行われる請求項1ないし5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】 遠心処理が5分間～2時間の範囲で行われる請求項6記載の方法。

【請求項8】 用いる植物細胞又は植物組織が被子植物由来である請求項1ないし7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】 用いる植物細胞又は植物組織が単子葉植物由来である請求項8記載の方法。

【請求項10】 用いる植物細胞又は植物組織がイネ科植物由来である請求項9記載の方法。

【請求項11】 用いる植物細胞又は植物組織がイネ又はトウモロコシである請求項10記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】アグロバクテリウムによる形質転換法は、一般的に、効率が高い、導入される遺伝子のコピー数が少ない、T-DNAという特定の領域を断片化させることなく導入できる、短期間の培養により形質転換体を得ることができるため培養変異が少ないなど、多くの優れた特徴を持っている。このため、さまざまな植物種で最も有用な形質転換の手段として広く用いられている。

【0003】このように、アグロバクテリウム法は非常に優れた植物の形質転換方法であるが、形質転換の成否ならびに効率は、植物種、遺伝子型ならびに用いる植物組織に依存して大きく異なるのが実状である(Potrykus et al. 1998(参考文献(33)))。すなわち、形質転換に成功していない植物種があるほか、ごく一部の品種のみ形質転換が可能な植物種も多い。また、利用可能な組織が限定されており大量の材料を取り扱うことができない植物種もある。遺伝子組換えにより実用的な品種を作成するには、多数の形質転換植物を作出した上で、目的とする形質を持った系統を選抜する必要がある。しかしながら、この目的に即し多数の形質転換体を容易に得ることができる作物の種類は、現状では一部に限定されている。

したがって、このような問題点を解決することができ改良手法の開発が強く望まれている。

【0004】アグロバクテリウムを介する形質転換方法自体は、植物種により供試材料や培養に用いる培地の組成などを異にするものの、材料となる組織にアグロバクテリウムの懸濁液を接触させ、共存培養の後に形質転換細胞の選抜を行い、形質転換植物を作出するという操作ではほぼ共通している。材料となる植物組織には対しては、通常、必要に応じ滅菌処理を行うがそれ以外に特別な処理を施すことなくアグロバクテリウムの感染が行われる(Rogers et al. 1988(参考文献(34))), Visser 1991(参考文献(38)), McCormick 1991(参考文献(29)), Lindsey et al. 1991(参考文献(28)))。従って、形質転換系の改良は、アグロバクテリウムの菌系、ベクター構成、培地組成、選抜マーカー遺伝子やプロモーターの種類、供試組織の種類などを中心に研究が行われてきた。

【0005】これに対し、アグロバクテリウムを接種する前の植物組織を、遺伝子導入が生じやすい生理的状态に変換するという考え方に基づく研究は、ほとんど行われていない。何らかの簡便な処理により、そのような生理的状态に変換することができればたいへん利用価値が高く、遺伝子導入効率の向上に加え、従来困難であった植物種や遺伝子型の形質転換を可能にする顕著な効果も期待される。これまでの植物組織への前処理に関する研究例としては、パーティクルガン(Bidney et al., 1992(参考文献(5)))および超音波(Trick et al., 1997(参考文献(37)))処理が上げられる。どちらも物理的に組織を付傷することでバクテリアの植物組織内への侵入を促し、感染対象となる植物細胞を増加させることを目的としている。しかしながら、これは従来より広く行われているリーフディスク法(Horsch et al., 1985(参考文献(17)))を発展させたものに過ぎず、新規な考え方にに基づく処理法ではない。なお、効果の程度や汎用性は明らかでなく、一般的な手法として用いられていないのが現状である。

## 【0006】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の目的は、従来のアグロバクテリウム法による遺伝子導入方法よりも高い効率で組織を付傷することなく簡便に遺伝子導入を行うことができる、植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法を提供することである。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】本願発明者らは、鋭意研究の結果、アグロバクテリウム属細菌を用いた遺伝子導入方法において、遺伝子導入に供する植物細胞又は植物組織を遠心処理することにより、遺伝子導入効率を有意に向上させることができることを見出し本発明を完成した。

【0008】すなわち、本発明は、植物細胞又は植物組織を遠心処理することを伴うアグロバクテリウム属細菌

菌を介して行われる植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法を提供する。

【0009】

【発明の実施の形態】本発明の方法では、アグロバクテリウム属細菌を介した遺伝子導入方法において、遺伝子を導入する植物細胞又は植物組織を遠心処理することを伴う。植物細胞又は植物組織は、遠心処理した後、通常の重力下でアグロバクテリウム属細菌と接触させてもよいし、遠心処理しながらアグロバクテリウム属細菌と接触させてもよい。好ましくは、植物細胞又は植物組織を遠心処理した後、通常の重力下でアグロバクテリウム属細菌と接触させる方法である。

【0010】遠心処理条件は、用いる植物の種類等に応じて適宜選択されるが、通常、100G～25万G、好ましくは500G～20万G、さらに好ましくは1000G～15万G程度の遠心加速度範囲で行われる。また、遠心処理の時間は、遠心加速度及び用いる植物の種類等に応じて適宜選択されるが、通常1秒間以上行うことが好ましい。なお、遠心時間の上限は特にないが、通常、10分間程度で目的を達成することができる。なお、遠心処理時間は、遠心加速度が大きい場合には極く短い時間、例えば1秒以下でも遺伝子導入効率を有意に向上させることができる。一方、遠心加速度が小さい場合には、遠心処理を長く行うことにより遺伝子導入効率を有意に向上させることができる。特に好ましい遠心処理条件は、500G～20万G、特に1000G～150000Gで1秒間～2時間程度の場合が多いが、その植物細胞又は植物組織にとっての適切な遠心処理条件は、ルーチンな実験により容易に設定することができる。

【0011】本発明の方法は、アグロバクテリウム属細菌と接触させる植物細胞又は植物組織として遠心処理したものをを用いる、又は遠心処理を行いながらアグロバクテリウム属細菌と接触させることを特徴とするものであり、アグロバクテリウム属細菌を用いた遺伝子導入あるいは形質転換方法自体としては、周知の方法をそのまま適用することができる。

【0012】アグロバクテリウム属細菌を用いた植物への遺伝子導入あるいは形質転換方法自体は、この分野において周知であり、広く用いられている。

【0013】土壌細菌アグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) が多くの双子葉植物に根頭癌腫病 (crown gall disease) を引き起こすことは古くから知られており、1970年代には、Tiプラスミドが病原性に関与すること、さらにTiプラスミドの一部であるT-DNAが植物ゲノムに組み込まれることが発見された。その後このT-DNAには癌腫の誘発に必要なホルモン (サイトカイニンとオーキシン) の合成に関与する遺伝子が存在し、細菌遺伝子でありながら植物中で発現することが明らかにされた。T-DNAの切り出しと植物への伝達にはTiプラス

ミド上のヴィルレンス領域 (vir領域) に存在する遺伝子群が必要であり、またT-DNAが切り出されるためにはT-DNAの両端に存在するボーダー配列が必要である。他のアグロバクテリウム属細菌である *Agrobacterium rhizogenes* もRiプラスミドによる同様なシステムを有している (図3及び図4)。

【0014】アグロバクテリウムの感染によってT-DNAが植物ゲノムに組み込まれるので、T-DNA上に所望の遺伝子を挿入するとこの遺伝子も植物ゲノムに組み込まれることが期待された。しかしながら、Tiプラスミドは190kb以上と巨大であるため、標準的な遺伝子工学手法ではプラスミド上のT-DNA上に遺伝子を挿入することは困難であった。そのため、T-DNA上に外来遺伝子を挿入するための方法が開発された。

【0015】まず、腫瘍性のTiプラスミドのT-DNAからホルモン合成遺伝子が除去されたディスアーム型の菌系 (disarmed strains) であるLBA4404 (Hoekema et al., 1983 (参考文献(12)))、C58C1 (pGV3850) (Zambryski et al., 1983 (参考文献(40)))、GV3Ti11SE (Fraley et al., 1985 (参考文献(9)))などが作製された (図3)。これらを用いることにより、所望の遺伝子をアグロバクテリウムのTiプラスミドのT-DNA中に、あるいは所望の遺伝子を有するT-DNAをアグロバクテリウムに導入する2種類の方法が開発された。このうちの一つは、遺伝子操作が容易で所望の遺伝子の挿入が可能であり、大腸菌で複製ができる中間ベクターを、アグロバクテリウムのディスアーム型TiプラスミドのT-DNA領域中に、三系交雑法 (triparental mating) (Ditta et al., 1980 (参考文献(8)))を介して相同組換えにより導入する方法であり、中間ベクター法と呼ばれる (Fraley et al., 1985 (参考文献(9))); Fraley et al., 1983 (参考文献(10))); Zambryski et al., 1983 (参考文献(40))、特開昭59-140885号 (EP116718))。もう一つは、バイナリーベクター (binary vector) 法とよばれるもので (図3)、T-DNAの植物への組み込みにvir領域が必要であるが、機能するために同じプラスミド上に存在する必要はないという結果 (Hoekema et al., 1983) に基づいている。このvir領域にはvirA、virB、virC、virD、virE及びvirGが存在し、(植物バイオテクノロジー事典 (エンタプライズ株式会社発行 (1989)))、vir領域とはこのvirA、virB、virC、virD、virE及びvirGの全てを含むものをいう。したがって、バイナリーベクターは、T-DNAをアグロバクテリウムと大腸菌の両方で複製可能な小さなプラスミドに組み込んだものであり、これをディスアーム型Tiプラスミドを有するアグロバクテリウムに導入して用いる。アグロバクテリウムへのバイナリーベクターの導入には、エレクトロポレーション法や三系交雑法などの方法により行うことができる。バイナリーベクターには、pBIN19 (Bevan, 1984 (参考文献(4)))、pBI121 (Jefferson, 1987 (参考文献(19)))、pGA4R2 (An et al., 1988 (参考文献

(2))、特開昭60-70080号 (EP120516) ) などがあり、これらをもとに数多くの新たなバイナリーベクターが構築され、形質転換に用いられている。また、Ri プラスミドのシステムにおいても、同様なベクターが構築され形質転換に用いられている。

【0016】アグロバクテリウムA281(Watson et al., 1975(参考文献(39)))は、強病原性 (super-virulent) の菌系であり、その宿主範囲は広く、形質転換効率も他の菌系より高い(Hood et al., 1987(参考文献(13)); Komari, 1989(参考文献(21)))。この特性は、A281が有するTiプラスミドのpTiBo542によるものである(Hood et al., 1984(参考文献(16)); Jin et al., 1987(参考文献(20)); Komari et al., 1986(参考文献(24)))。

【0017】pTiBo542を用いて、これまでに2つの新しいシステムが開発されている。一つはpTiBo542のディスアーム型のTiプラスミドを有する菌系EHA101(Hood et al., 1986)およびEHA105(Hood et al., 1993)を用いたものであり、これらを上述のバイナリーベクターシステムに適用することにより、形質転換能力の高いシステムとして種々の植物の形質転換に利用されている。もう一つは、スーパーバイナリーベクター ('super-binary' vector) (Hiei et al., 1994(参考文献(11)); Ishida et al., 1996(参考文献(18)); Komari et al., 1999(参考文献(26)), W094/00977号、W095/06722号)システムである(図4)。このシステムは、vir領域 (virA、virB、virC、virD、virE及びvirG (以下、これらをそれぞれ「vir断片領域」ということもある。)) を持つディスアーム型のTiプラスミドおよびT-DNAを有するプラスミドからなることから、バイナリーベクターシステムの一つである。しかしながら、T-DNAを有する側のプラスミド、即ちバイナリーベクターにvir断片領域のうち、少なくとも一つのvir断片領域を実質的に取除いたvir領域の断片 (このうち好ましくは少なくともvirB又はvirGを含む断片、さらに好ましくはvirB及びvirGを含む断片) を組み込んだ(Komari, 1990a(参考文献(22)))スーパーバイナリーベクターを用いる点で異なる。なお、スーパーバイナリーベクターを有するアグロバクテリウムに、所望の遺伝子を組み込んだT-DNA領域を導入するには、三系交雑法を介した相同組換えが容易な手法として利用できる(Komari et al., 1996(参考文献(25)))。このスーパーバイナリーベクターシステムは、上述の種々のベクターシステムと比べて、多くの植物種で非常に高い形質転換効率をもたらすことが明らかとなっている(Hiei et al., 1994(参考文献(11)); Ishida et al., 1996(参考文献(18)); Komari, 1990b(参考文献(23)); Li et al., 1996(参考文献(27)); Saito et al., 1992(参考文献(35)))。

【0018】本発明の方法においては、宿主となるアグロバクテリウム属細菌としては、特に限定されないが、*Agrobacterium tumefaciens* (例えば上述の*Agrobacter*

*tumefaciens* LBA4404(Hoekema et al., 1983(参考文献(12)))およびEHA101(Hood et al., 1986(参考文献(15)))を好ましく用いることができる。

【0019】本発明の方法によれば、アグロバクテリウム属細菌における病原性 (vir) 領域の遺伝子群の発現に基づく遺伝子導入系であれば、特に限定されることなく有意な効果を得ることができる。したがって、上述の中間ベクター、バイナリーベクター、強病原性のバイナリーベクター、スーパーバイナリーベクターなどいずれのベクターシステムに対しても用いることができ、本発明による効果を得ることができる。これらのベクター類を改変した異なるベクターシステムを用いた場合においても同様である (例えば、アグロバクテリウム属細菌のvir領域の一部または全部を切り出し付加的にプラスミド中に組み込む、vir領域の一部または全部を切り出し新たなプラスミドの一部としてアグロバクテリウムに導入するなど)。また、当然ではあるが本発明の方法によれば、野生型のアグロバクテリウム属細菌においても、植物へ野生型のT-DNA領域の導入効率を高め、事実上感染効率を向上することができる。

【0020】植物に導入しようとする所望の遺伝子は、上記プラスミドのT-DNA領域中の制限酵素部位に常法により組み込むことができ、当該プラスミドに同時に若しくは別途組込んだカナマイシン、パロモマイシン等の薬剤に対する耐性を有する遺伝子等の適当な選択マーカーに基づいて選択することができる。大型で多数の制限部位を持つものは、通常のサブクローニングの手法では所望のDNAをT-DNA領域内に導入することが必ずしも容易でないことがある。このような場合には、三系交雑法により、アグロバクテリウム属細菌の細胞内での相同組換えを利用することで目的のDNAを導入することができる。

【0021】また、プラスミドを*Agrobacterium tumefaciens*等のアグロバクテリウム属細菌に導入する操作は従来法により行うことができ、例としては、上記した三系交雑法やエレクトロポレーション法、エレクトロインジェクション法、PEGなどの化学的な処理による方法などが含まれる。

【0022】植物に導入しようとする遺伝子は、従来の技術と同様に基本的にはT-DNAの左右境界配列の間に配置されるものである。しかし、プラスミドが環状であるため、境界配列の数は1つでもよく、複数の遺伝子を異なる部位に配置しようとする場合には、境界配列が3個以上あってもよい。また、アグロバクテリウム属細菌中で、TiまたはRiプラスミド上に配置されてもよく、または他のプラスミド上に配置されてもよい。さらには、複数の種類のプラスミド上に配置されてもよい。

【0023】アグロバクテリウム属細菌を介して遺伝子導入を行う方法は、植物細胞又は植物組織をアグロバクテリウム属細菌と単に接触させることにより行うことができる。例えば、 $10^6 \sim 10^{11}$  細胞/ml程度の細胞

濃度のアグロバクテリウム属細菌懸濁液を調製し、この懸濁液中に植物細胞又は植物組織を3～10分間程度浸漬後、固体培地上で数日間共存培養することにより行うことができる。

【0024】遺伝子導入に供される細胞又は組織は、何ら限定されるものではなく、葉、根、茎、実、その他いずれの部位であってもよいし、カルスのような脱分化したものであっても脱分化していない胚等であってもよい。また、植物の種類も何ら限定されないが、被子植物が好ましく、被子植物ならば双子葉植物でも単子葉植物でもよい。

【0025】下記実施例において具体的に示されるように、本発明の方法によれば、従来のアグロバクテリウム法に比較して、遺伝子導入の効率が有意に向上する。

#### 【0026】

【実施例】以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

#### 【0027】実施例1

(1) アグロバクテリウムの菌系およびプラスミド  
アグロバクテリウムおよびそのベクターには、LBA4404 (pBI121) (pBI121は米国クローンテック社より市販、(Jefferson RA 1987(参考文献(19))), LBA4404 (pIG121 Hm) (Hiei, Y. et al., 1994(参考文献(11))), LBA4404 (pTOK233) (Hiei et al., 1994 (参考文献(11)))およびLBA4404 (pSB133) (図2)を用いた。

【0028】なお、pSB133の構築は、以下のように行った。pGA482 (An G et al., 1985(参考文献(3)))を制限酵素Sal Iで消化して得た6.2 kbのDNA断片を、pSB11 (Komari et al., 1996(参考文献(25)))をSal Iで消化して得られる5.1 kbpのDNA断片と結合してプラスミドを作製した。次いで、このプラスミドを制限酵素EcoRI、Bgl IIで消化して8.6 kbのDNA断片を得た。このDNA断片を平滑化処理し、Bgl IIIリンカー (TaKaRa社製)を挿入してプラスミドpSB27を得た。このpSB27を制限酵素Hind IIIで消化し、pIG221 (Ohta S et al., 1990(参考文献(32)))をHind IIIで消化することで得られる3.1 kbの35Sプロモーター及びイントロン介在GUS遺伝子を含む断片を挿入してpSB33を得た。pSB33を大腸菌LE392株に導入した後、Triparental mating法 (Ditta G et al., 1980(参考文献(8)))により、pSB1 (Komari et al., 1996(参考文献(25)))を有するアグロバクテリウムLBA4404株に導入した。pSB133はアグロバクテリウム内でpSB1とpSB33の間の相同組換えにより得られた。pBI121のT-DNA領域には、ノバリン合成酵素遺伝子 (nos) のプロモーターにより制御されるカナマイシン耐性遺伝子 (nptII)、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の35Sプロモーターにより制御されるGUS遺伝子を有する。pIG121Hm及びpTOK233のT-DNA領域には、nosプロモーターにより制御されるnptII遺伝子、35Sプロモーターにより制御されるho

t遺伝子、35Sプロモーターにヒマのカタラーゼ遺伝子のイントロンが介在するGUS遺伝子を有する。また、pSB133のT-DNA領域には、nosプロモーターにより制御されるnptII遺伝子、CaMVの35Sプロモーターに制御されヒマのカタラーゼ遺伝子のイントロンが介在するGUS遺伝子を有する (図2)。なお、pSB133及びpTOK233は形質転換能力が高いスーパーバイナリーベクター (Komari, T. et al., 1999(参考文献(26)))である。

#### 【0029】(2) 供試品種および組織

供試品種として、日本稲品種のコシヒカリおよび月の光を用いた。開花後8～14日目の未熟種子の穎を除去し、70%エタノールで数秒、ツイーン20を含む1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液で15分間滅菌処理を行った。滅菌水で数回洗浄後、長さ1.5～2mmの未熟胚を摘出し供試組織とした。

#### 【0030】(3) 遠心処理

イネ未熟胚を滅菌水入りのチューブの中に入れ、微量高速遠心機、大型高速遠心機もしくは超高速遠心機を用いて、760G～150,000Gの遠心処理を行った。遠心処理終了後、未熟胚にアグロバクテリウムを接種した。

#### 【0031】(4) 接種および共存培養

未熟胚への接種および共存培養の方法は、Hiei et al. (1994) (参考文献(11)) によった。すなわち、遠心処理後、チューブ内部の滅菌水を除き、アグロバクテリウムの懸濁液を加え、5～30秒間ボルテックスミキサーにより攪拌した。バクテリア懸濁液の調製は、AB培地 (Chilton, M-D et al., 1974(参考文献(6))) 上で3～10日間培養したアグロバクテリウムのコロニーを白金耳でかきとり、修正AA培地 (AA主要無機塩類、AAアミノ酸及びAAビタミン類 (Toriyama K. et al., 1985(参考文献(36))), MS微量塩類 (Murashige, T et al., 1962(参考文献(30))), 1.0 g/l カザミノ酸、100  $\mu$ Mアセトシリンゴン、0.2 Mショ糖、0.2 Mグルコース) に懸濁することにより行った。約5分間室温で静置した後、共存培養用の培地に置床した。共存培養用の培地としては、2N6-AS培地 (Hiei et al. 1994(参考文献(11))) の無機塩類をR2培地 (Ohira et al. 1973(参考文献(31))) の組成に変更して用いた。ただし、主要無機塩類 ( $\text{KNO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) については1/2の濃度で培地に添加した。なお、接種菌密度は $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$  cfu/ml に調整した。共存培養は3～13日間行い、一部の未熟胚についてX-Glucを処理することによるGUS発現を調査した (Hiei et al. 1994) (参考文献(11))。すなわち、共存培養処理直後、組織を0.1% Triton X-100 を含む0.1 M リン酸緩衝液 (pH6.8) に浸漬し、37℃で1時間静置した。リン酸緩衝液でアグロバクテリウムを除去した後、1.0 mM 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-グルクロン酸 (X-gluc) および20% メタノールを含むリン酸緩衝液を添加した。37℃で24時間処理した後、青色の呈色を示す組織を顕微

鏡下で観察した。

#### 【0032】(5) 形質転換細胞の選抜

共存培養後、未熟胚およびカルスを250mg/l カルベニシリンおよび250mg/l セフトキシムを含み、200mg/l パロモマイシンまたは10~30mg/l ハイグロマイシンを含む1次選抜培地に移植し、30℃明条件下で1~2週間培養した。1次選抜培地には、Hiei et al. (1994) (参考文献(11)) による2N6K培地に30g/lのD-ソルビトールを添加した培地を用いた(K培地)。また、Hiei et al. (1994) (参考文献(11)) による2N6培地(N6の無機塩およびビタミン類(Chu C. C. 1978 (参考文献(7)))、1 g/l カザミノ酸、2 mg/l 2, 4-D)の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を232 mg/lとしAA培地(Toriyama et al., 1985(参考文献(36)))の氨基酸類を添加した培地についても試験に供した(N培地)。

【0033】1次選抜培地上に形成されたカルスを、250 mg/lセフトキシムおよび250mg/lカルベニシリンを含み、200mg/lパロモマイシンもしくは80mg/lハイグロマイシンを含む2次選抜培地上に移植し、30℃明条件下で1~2週間の培養を行った。2次選抜培地には、Hiei et al. (1994) (参考文献(11)) によるN6-7培地の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を232 mg/lとしAA培地(Toriyama et al., 1985(参考文献(36)))の氨基酸類を添加した培地を使用した。なお、パロモマイシンを含有する上記の1次および2次選抜培地には、培地固化剤に8g/lアガロースを使用した。耐性カルスの出現率は、2次選抜後に調査した。

#### 【0034】(6) 形質転換体の再分化

未熟胚の胚盤部位から得られた選抜薬剤耐性のカルスを、250mg/lカルベニシリンおよび250mg/lセフトキシムを含み、100mg/lパロモマイシンまたは50mg/lハイグロマイシンを含む再分化培地N6S3培地(Hiei et al. 1994 (参考文献(11)))上に置床した。

【0035】(7) 再分化個体におけるGUS発現の調査  
25℃明条件下で4~5週間の再分化培養を行なって得られた各薬剤耐性の再分化植物の葉片を、上記のようにX-Glucを処理することにより、GUS発現を調査した(Hiei et al. 1994 (参考文献(11)))。再分化個体は500倍のHypoxon水溶液中に移植し、25℃明条件下で約2週間育苗した後、温室内のポットへ移植した。

#### 【0036】(8) 結果

##### (i) 遠心処理効果の検討

微量高速遠心機、大型高速遠心機および超高速遠心機を用いてイネの未熟胚への遠心処理効果を調べた結果、10KGから100KGの範囲の処理で遺伝子の導入効率が高まった(表1, 2, 3, 6)。処理時間については10分間の処理で明らかな効果が認められた(表4, 5)。また、コシヒカリと月の光の品種間でのGUSの一過性発現頻度に違いは認められなかった。なお、遠心処理は遺伝子導入効率の向上だけでなくカルス誘導を促進する効果が認められたことから、ほかの植物種を含めて、培養におけるカルスの誘

導および増殖に有用であることが示唆された。

【0037】表6の結果から超高速遠心機を用いた250KGの60分処理では、月の光未熟胚からのカルス誘導が全く認められなかった。しかし、110KGの60分処理ではカルス誘導が確認され、GUS発現も高率で認められた。同様にコシヒカリについても超高速遠心機を用いた250 KG・60分処理では、未熟胚からのカルス誘導が認められなかった。以上の結果から、イネ未熟胚における遠心処理の効果の範囲は5KG~200KGと考えられ、処理方法の簡便性を考慮すると微量高速遠心機および大型高速遠心機を使用する場合には、20KG, 40KG処理が適当と考えられる。さらに表9, 10, 11の結果から、形質転換能力が高いとされるスーパーバイナリーベクターを有するLBA4404(pSB133)のみならず、通常のバイナリーベクターであるLBA4404(pIG121Hm)でも、20KG・60分の遠心処理により未熟胚を用いた形質転換が可能であることが明らかとなった。

##### 【0038】(ii) 遠心処理と共存培養期間の検討

表-7, 8の結果から共存培養期間が3日より6, 13日がトランジェントアッセイで高いGUS発現効率を示した。共存培養期間が9日についても別の実験で高いGUS発現が認められた。現在、共存培養期間が異なる各種未熟胚を一次選抜培地上(10ppmハイグロマイシン, 200ppmパロモマイシン)で培養しているが、9, 13日共存の区では、3, 6日の共存区と比較して薬剤耐性カルスの出現率が低い傾向にある。

##### 【0039】(iii) 遠心処理による形質転換効率の調査

現在、上記により作出したGUS陽性の形質転換体(表4, 5)をそれぞれ順化し、栽培を継続している。一部分の系統については、採種を終了し稔性調査を行った。その結果、遠心処理した形質転換体は無処理の形質転換体(コシヒカリ、月の光)と比較し、形態および稔性に差は認められなかった。

##### 【0040】Hiei et al. (1994 (参考文献(11)))

は、イネのカルスを材料として比較的高い効率で形質転換が行うことができることを報告している。また、Aldemita RR et al. 1996(参考文献(1))は、イネの未熟胚を用いた形質転換例を報告している。これらの形質転換手法をより効率よく安定して実施するために、上述した遠心処理法は非常に有効である。特に、未熟胚は栽培環境に左右されやすく形質転換に好適な未熟胚材料を常時得ることは容易ではないが、遠心処理を施すことにより安定した高い形質転換効率を維持することが可能である。Hiei et al. (1994 (参考文献(11)))は、形質転換能力の高いベクターであるスーパーバイナリーベクターがイネの形質転換効率を向上させることを示した。また、Aldemita et al., 1996(参考文献(1))によれば、スーパーバイナリーベクターのLBA4404(pTOK233)を用いた試験においてのみ、形質転換体を得ている。本研究における遠心処理法は、通常のバイナリーベクターを用いた場合



においても、スーパーバイナリーベクターに匹敵するか、それ以上の遺伝子導入効率を得ることができる。また、スーパーバイナリーベクターと遠心処理法を併用することにより、より一層効率を向上させることが可能である。さらに、遠心処理法を用いることにより、これま

で全く形質転換体を得ることができなかった品種においても形質転換体を得ることができるものと推察される。

## 【0041】

【表1】表1 各種遠心処理と共存培養後のGUS発現結果 (供試菌系: LBA4404/pSB133)

各品種	接種菌濃度 (cfu/ml)	無処理	遠心加速度		
			760 G	8,500 G	19,100 G
コシヒカリ	$1 \times 10^8$	3/10 (+)	6/10 (+)	7/10 (++)	7/10 (+++)
	$1 \times 10^9$	2/10 (+)	0/10 (-)	4/10 (++)	7/10 (+++)
月の光	$1 \times 10^8$	4/10 (+)	3/10 (+)	9/10 (+++)	7/10 (+++)
	$1 \times 10^9$	1/10 (+)	6/10 (++)	2/10 (+)	7/10 (+++)

遠心処理時間: 10分、共存培養期間: 3~5日、GUS陽性

未熟胚数/供試未熟胚数

( )内は胚盤におけるGUS発現領域の面積 -: なし, +:

小, ++: 中, +++: 大

## 【0042】

【表2】表2 コシヒカリ未熟胚からのパロモマイシン耐性カルスの出現率 (供試菌系: LBA4404/pSB133)

各選抜 培地	接種菌濃度 (cfu/ml)	無処理	遠心加速度		
			760 G	8,500 G	19,100 G
N 培地	$1 \times 10^8$	4.8% (1/21)	0.0% (0/22)	15.0% (3/20)	31.8% (7/22)
	$1 \times 10^9$	4.3% (1/23)	4.5% (1/22)	16.7% (3/18)	13.3% (2/15)
K 培地	$1 \times 10^8$	0.0% (0/21)	0.0% (0/22)	14.3% (3/21)	18.2% (4/22)
	$1 \times 10^9$	0.0% (0/23)	0.0% (0/21)	0.0% (0/19)	0.0% (0/22)

耐性カルスの出現した未熟胚数/供試未熟胚数、2次選

抜終了時調査

遠心処理時間: 10分、共存培養期間: 3~5日

## 【0043】

【表3】表3月の光未熟胚からのパロモマイシン耐性カルスの出現率 (供試菌系: LBA4404/pSB133)

各選抜 培地	接種菌濃度 (cfu/ml)	無処理	遠心加速度		
			760 G	8,500 G	19,100 G
N 培地	$1 \times 10^8$	0.0% (0/11)	0.0% (0/11)	30.0% (3/10)	36.4% (4/11)
	$1 \times 10^9$	0.0% (0/11)	9.1% (1/11)	27.3% (3/11)	54.5% (6/11)
K 培地	$1 \times 10^8$	0.0% (0/10)	0.0% (0/15)	9.1% (1/11)	9.1% (1/11)
	$1 \times 10^9$	0.0% (0/11)	0.0% (0/11)	0.0% (0/11)	45.5% (5/11)

耐性カルスの出現した未熟胚数/供試未熟胚数、2次選

抜終了時調査

遠心処理時間: 10分、共存培養期間: 3~5日

## 【0044】

【表4】表4遠心処理時間と共存培養後のGUS発現結果 (品種: コシヒカリ)

菌系及び プラスミド	無処理	遠心処理時間		
		10 分	30 分	60 分
LBA4404 (pSB133)	9/10 (+)	9/10 (++)	10/10 (++)	10/10 (+++)
LBA4404 (pTK233)	9/10 (+)	10/10 (++)	10/10 (++)	10/10 (+++)

遠心加速度: 20,000G、供試品種: コシヒカリ GUS陽性

未熟胚数/供試未熟胚数

胚盤領域におけるGUS発現領域の面積 +: 小, ++: 中, ++

+: 大

## 【0045】

【表5】表5 遠心処理時間とパロモマイシン耐性カルスの出現率 (品種: コシヒカリ)



各 選 抜 培地	培養条件	無処理	遠心処理時間		
			10分	30分	60分
N 培地	明 所 (30℃)	0.0% (0/31)	34.3% (12/35)	35.0% (14/40)	53.3% (16/30)
	暗 所 (30℃)	0.0% (0/32)	54.1% (20/37)	34.2% (13/38)	58.6% (17/29)
K 培地	明 所 (30℃)	0.0% (0/31)	20.0% ( 7/35)	38.5% (15/39)	40.0% (12/30)
	暗 所 (30℃)	0.0% (0/32)	48.8% (17/35)	41.0% (16/39)	33.3% (10/30)

遠心加速度：20,000G、共存培養期間：3～5日、2次選抜

【0046】

終了時調査

【表6】表6 遠心処理強度と共存培養後のGUS発現(品

種：月の光)

種：月の光)

各 種 遠 心 処理	共存培養 期間	未熟胚数			
		胚盤における GUS 発現頻度			
		—	±	+	++
無処理	3日間	6	4	0	0
	6日間	0	2	6	2
20KG <sup>1)</sup>	3日間	0	0	2	8
	6日間	0	0	2	8
40KG <sup>2)</sup>	3日間	1	0	1	8
	6日間	0	0	0	10
110KG <sup>3)</sup>	3日間	1	0	5	4
	6日間	0	0	2	8
250KG <sup>3)</sup>	3日間	10	0	0	0
	6日間	10	0	0	0

供試菌系：LBA4404/pIG121Hm、遠心処理時間：60分

+：1/8-1/4, ++：>1/4

1) 微量高速遠心機 2) 大型高速遠心機 3) 超高速遠心機

【0047】

胚盤部に占めるGUS発現領域の割合 -：なし, ±：<1/8,

【表7】表7 遠心処理および共存培養期間と共存培養後のGUS発現(品種：月の光)

各種遠心 処理	共存培養 期間	未熟胚数			
		胚盤における GUS 発現頻度			
		—	±	+	++
無処理	3日間	5	4	1	0
	6日間	0	6	2	2
	13日間	0	5	2	3
20KG <sup>1)</sup>	3日間	0	2	5	3
	6日間	0	1	3	6
	13日間	0	1	3	6
40KG <sup>2)</sup>	3日間	0	1	7	2
	6日間	0	0	8	2
	13日間	0	1	5	4

供試菌系：LBA4404/pIG121Hm、1)微量高速遠心機 2) +:1/8-1/4, ++:>1/4

大型高速遠心機 【0048】

それぞれの回転数に対し、60分間の遠心処理

【表8】表8 遠心処理および共存培養期間と共存培養

胚盤部に占めるGUS発現領域の割合 -:なし, ±:<1/8, 後のGUS発現(品種:コシヒカリ)

各種遠心 処理	共存培養 期間	未熟胚数			
		胚盤における GUS 発現頻度			
		—	±	+	++
無処理	3日間	7	3	0	0
	6日間	3	1	0	0
	13日間	1	6	2	1
20KG <sup>1)</sup>	3日間	0	0	1	9
	6日間	0	0	2	8
	13日間	0	0	1	9
40KG <sup>2)</sup>	3日間	1	0	4	5
	6日間	0	0	0	10
	13日間	0	0	1	9

供試菌系：LBA4404/pIG121Hm、1)微量高速遠心機 2) +:1/8-1/4, ++:>1/4

大型高速遠心機 【0049】

それぞれの回転数に対し、60分間の遠心処理

【表9】表9 LBA4404(pBI121)による形質転換結果(品

胚盤部に占めるGUS発現領域の割合 -:なし, ±:<1/8, 種:月の光)

各種処理	供試未熟胚数	順化数	GUS 陽性数	形質転換効率
無処理	50	17	12	24.0(%)
遠心処理	150	60	54	36.0(%)

遠心処理:20KG・60分 共存培養5日間

【表10】表10 LBA4404(pIG121Hm)による形質転換結果(品種:月の光)

【0050】

各種処理	供試未熟胚数	順化数	GUS 陽性数	形質転換効率
無処理	40	9	3	7.5 (%)
遠心処理	47	10	5	10.6 (%)

遠心処理:20KG・60分 共存培養5日間  
【0051】

【表11】表11 LBA4404(pBI121)による形質転換結果  
(品種:コシヒカリ)

各種処理	供試未熟胚数	順化数	GUS 陽性数	形質転換効率
無処理	49	4	2	4.1 (%)
遠心処理	274	35	27	9.9 (%)

遠心処理:20KG・60分 共存培養5日間  
【0052】

【表12】表12 LBA4404(pSB133)による形質転換結果  
(品種:コシヒカリ)

各種処理	供試未熟胚数	順化数	GUS 陽性数	形質転換効率
無処理	63	0	—	0.0 (%)
遠心処理	281	30	23	8.2 (%)

遠心処理:20KG・60分 共存培養3日間  
【0053】実施例2

大きさ約1.2 mmのトウモロコシ未熟胚(品種A188、農林水産省生物資源研究所より入手)を無菌的に取り出し、LS-inf液体培地で一回洗浄した。遠心管に未熟胚と100  $\mu$ Mのアセトシリンゴンを含むLS-inf培地2.0 mlに約 $1 \times 10^9$  cfu/mlの濃度で、*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404(pSB131) (Ishida et al. 1996(参考文献(18)))を懸濁した液を加え、40,000G、4℃で30分間遠心処理した。対照の未熟胚は、前記と同様の細菌懸濁液中で30分間、室温で静置した。処理後、緩やかに攪拌した後、胚軸面が培地に接するようにLS-AS培地に置床した。また、遠心処理後の未熟胚への接種は、以下の通り行った。無菌的に取り出した未熟胚をLS-inf液体培地で一回洗浄した後、同液体培地を含む遠心管に移し、20 KGまたは40 KGで4℃、1時間の遠心処理を行った。対照は液体培地中で1時間、室温で静置した。処理後、液体培地を除き、約 $1 \times 10^9$  cfu/mlの濃度でLBA4404(pSB131)を懸濁した液を加え、緩やかに攪拌した。5分間室温で静置した後、胚軸面が培地に接するように10  $\mu$ M  $\text{AgNO}_3$ を含むLS-AS培地に置床した。25℃、暗黒下で3日間共存培養した後、一部の未熟胚を採取し、実施例1と同様にX-glucによりGUS遺伝子のトランジェントな発現を調査

した。なお、上記の培地および培養法は、Ishida, Y. et al. 1996(参考文献(18))に記載の方法に従った。

【0054】LBA4404(pSB131)を接種したA188未熟胚でのGUS遺伝子のトランジェントな発現を表13に示す。いずれの未熟胚もGUS遺伝子の発現を示したが、対照の未熟胚に比べ、遠心処理を行った未熟胚では、より広い範囲での発現を示すものが多く確認された。遠心処理による遺伝子導入部位の増大は、アグロバクテリウム菌とともに遠心処理を行った場合、遠心処理後アグロバクテリウム菌を接種した場合の両方で認められた。また、遠心強度及び処理時間を変えた場合でも対照に比べより広い範囲でのGUS遺伝子の発現が認められた。

【0055】以上の結果から、遠心処理した未熟胚を選抜培地で培養すれば、対照に比べより高い効率で、形質転換植物の得られる可能性が示された。また、従来のアグロバクテリウム法では形質転換できなかったA188以外のトウモロコシ品種 (Ishida et al. 1996(参考文献(18)))についても遠心処理することにより形質転換植物の得られる可能性が示唆された。

【0056】

【表13】表13 A188未熟胚でのGUS遺伝子のトランジェントな発現

試験	処理		供試 未熟胚数	GUS 遺伝子の発現			
	KG	min		+++	++	+	-
1	40	30	27	7	10	10	0
	対照	30	30	1	17	12	0
2	40	60	20	0	3	17	0
	20	60	20	0	10	10	0
	対照	60	20	0	1	19	0

対照は1 Gでの処理。試験1はアグロバクテリウム菌共存下で遠心処理を行った。試験2は遠心処理後、アグロバクテリウム菌の接種を行った。

#### 【0057】

【発明の効果】本発明により、従来のアグロバクテリウム法による遺伝子導入方法よりも高い効率で、組織を付傷することなく簡便に遺伝子導入を行うことができる、植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法が提供された。本発明の方法は、単子葉植物に対しても双子葉植物に対しても適用可能である。

#### 【0058】参考文献

- (1) Aldemita RR, Hodges TK (1996) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of japonica and indica rice varieties. *Planta* 199: 612-617
- (2) An, G., Evert, P.R., Mitra, A. and Ha, S.B. (1988) Binary vectors. In Gelvin, S.B. and Schilperoort, R.A. (eds.), *Plant Molecular Biology Manual A* 3. Kluwer Academic Press, Dordrecht, pp. 1-19.
- (3) An, G., Watson, B.D., Stachel, S., Gordon, M.P. & Nester, E.W., (1985) New cloning vehicles for transformation of higher plants. *EMBO J.*, 4:277-288.
- (4) Bevan, M. (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.*, 12, 8711-8721.
- (5) Bidney, D., Scelonge, C., Martich, J., Burrus, M., Sims, L., and Huffmann G. (1992) Microprojectile bombardment of plant tissues increases transformation frequency by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Biol.*, 18, 301-313.
- (6) Chilton, M.-D., Currier, T.C. Farrand, S.K. Bendich, A.J. Gordon, M.P. & Nester E.W. (1974) *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71:3672-3676
- (7) Chu, C. C., (1978) *Proc. Symp. Plant Tissue Culture*, Science Press Peking, pp.43-50
- (8) Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D. and Helinski, D.R. (1980) Broadhost range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: Construction of gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 7347-7351.
- (9) Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Eichholtz, D.A. and Flick, J.S. (1985) The SEV system: a new disarmed Ti plasmid vector for plant transformation. *Bio/technology*, 3, 629-635.
- (10) Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Sanders, P.R., Flick, J.S., Adams, S.P., Bittner, M. L., Brand, L.A., Fink, C.L., Fry, J.S., Galluppi, G.R., Goldberg, S.B., Hoffmann, N.L. and Woo, S.C. (1983) Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80, 4803-4807.
- (11) Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T. and Kumashiro, T. (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal*, 6, 271-282.
- (12) Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J. and Schilperoort, R.A. (1983) A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature*, 303, 179-180.
- (13) Hood, E.E., Fraley, R.T. and Chilton, M.-D. (1987) Virulence of *Agrobacterium tumefaciens* strain A281 on legumes. *Plant Physiol*, 83, 529-534.
- (14) Hood, E.E., Gelvin, S.B., Melchers, L.S. and Hoekema, A. (1993) New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Res.*, 2, 208-218.
- (15) Hood, E.E., Helmer, G.L., Fraley, R.T. and Chilton, M.-D. (1986) The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *J. Bacteriol.*, 168, 1291-1301.
- (16) Hood, E.E., Jen, G., Kayes, L., Kramer, J., Fraley, R.T. and Chilton, M.-D. (1984) Restriction endonuclease map of pTiBo542, a potential Ti-plasmid vector for genetic engineering of plants. *Bio/technology*, 2, 702-709.
- (17) Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffmann, N. L., Eichholtz, D., Rogers, S. G. and Fraley, R. T. (1985)

A simple and general method for transferring gene  
s into plants. Science 227, 1229-1231.

(18) Ishida, Y., Saito, H., Ohta, S., Hiei, Y., Ko  
mari, T. and Kumashiro, T. (1996) High efficiency  
transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by  
*Agrobacterium tumefaciens*. Nature Biotechnol., 14,  
745-750.

(19) Jefferson, R.A. (1987) Assaying chimeric gene  
s in plants: the GUS gene fusion system. Plant Mo  
l. Biol. Rep., 5, 387-405.

(20) Jin, S., Komari, T., Gordon, M.P. and Nester,  
E.W. (1987) Genes responsible for the supervirule  
nce phenotype of *Agrobacterium tumefaciens* A281.

J. Bacteriol., 169, 4417-4425.

(21) Komari, T. (1989) Transformation of callus cu  
ltures of nine plant species mediated by *Agrobacte*  
*rium*. Plant Sci., 60, 223-229.

(22) Komari, T. (1990a) Genetic characterization o  
f double-flowered tobacco plant obtained in a tran  
sformation experiment. Theor. Appl. Genet., 80, 167  
-171.

(23) Komari, T. (1990b) Transformation of cultured  
cells of *Chenopodium quinoa* by binary vectors that  
carry a fragment of DNA from the virulenceregion  
of pTiBo542. Plant Cell Reports, 9, 303-306.

(24) Komari, T., Halperin, W. and Nester, E.W. (19  
86) Physical and functional map of supervirulent A  
*grobacterium tumefaciens* tumor-inducing plasmid pT  
iBo542. J. Bacteriol., 166, 88-94.

(25) Komari, T., Hiei, Y., Saito, Y., Murai, N. an  
d Kumashiro, T. (1996) Vectors carrying two separat  
e T-DNAs for co-transformation of higher plants me  
diated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregatio  
n of transformants free from selection markers. Pl  
ant J, 10, 165-174.

(26) Komari, T. and Kubo, T. (1999) Methods of Gen  
etic Transformation: *Agrobacterium tumefaciens*. In  
Vasil, I.K. (ed.) Molecular improvement of cereal  
crops. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp.  
43-82.

(27) Li, H.-Q., Sautter, C., Potrykus, I. and Puon  
ti-Kaerlas, J. (1996) Genetic transformation of cas  
sava (*Manihot esculenta* Crantz). Nature Biotechno  
l., 14, 736-740.

(28) Lindsey, K., Gallois, P. and Eady, C. (1991)  
Regeneration and transformation of sugarbeet by *Ag*  
*robacterium tumefaciens*. Plant Tissue Culture Manu  
al B7:1-13. Kluwer Academic Publishers.

(29) McCormick, S. (1991) Transformation of tomato  
with *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Tissue Cult.

ure Manual B6:1-9. Kluwer Academic Publishers.

(30) Murashige, T. and Skoog, F. (1962) Physiol. P  
lant 15:473-497.

(31) Ohira, K., Ojima, K., Fujiwara, A. (1973) Stu  
dies on the nutrition of rice cell culture I. A sim  
ple, defined medium for rapid growth in suspension  
culture. Plant Cell Physiol., 14:1113-1121.

(32) Ohta, S., Mita, S., Hattori, T., Namamura,  
K. (1990) Construction and expression in tobacco of  
a  $\beta$ -glucuronidase (GUS) reporter gene containing  
an intron within the coding sequence. Plant Cell P  
hysiol. 31: 805-813.

(33) Potrykus, I., Bilang, R., Futterer, J., Saut  
ter, C. and Schrott, M. (1998) Agricultural Biotec  
nology, NY: Marcel Dekker Inc. pp. 119-159.

(34) Rogers, S.G., Horsch, R.B. and Fraley, R. T.  
(1988) Gene transfer in plants: Production of tran  
sformed plants using Ti plasmid vectors. Method fo  
r Plant Molecular Biology, CA: Academic Press Inc.  
pp. 423-436.

(35) Saito, Y., Komari, T., Masuta, C., Hayashi,  
Y., Kumashiro, T. and Takanami, Y. (1992) Cucumber  
mosaic virus-tolerant transgenic tomato plants ex  
pressing a satellite RNA. Theor. Appl. Genet., 83,  
679-683.

(36) Toriyama, K. and Hinata, K. (1985) Plant Sci.  
41:179-183

(37) Trick, H.N. and Finer, J.J. (1997) SAAT: soni  
cation-assisted *Agrobacterium*-mediated transformat  
ion. Transgenic Research 6:329-336.

(38) Visser, R.G.F. (1991) Regeneration and transf  
ormation of potato by *Agrobacterium tumefaciens*. Pl  
ant Tissue Culture Manual B5:1-9. Kluwer Academic  
Publishers.

(39) Watson, B., Currier, T.C., Gordon, M.P., Chil  
ton, M.-D. and Nester, E.W. (1975) Plasmid required  
for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. J Bac  
teriol, 123, 255-264.

(40) Zambryski, P., Joos, H., Genetello, C., Leema  
ns, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti p  
lasmid vector for the introduction of DNA into pla  
nt cells without alteration of their normal regene  
ration capacity. EMBO J, 2, 2143-2150.

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の方法に好ましく用いることができるス  
ーパーバイナリーベクターの例であるpTOK233の構築方  
法を示す図である。

【図2】本発明の方法に好ましく用いることができるス  
ーパーバイナリーベクターの例であるpSB133の遺伝子地  
図を示す図である。

【図3】アグロバクテリウム属細菌の主要な2種類のベクターシステムである中間ベクターシステムとバイナリーベクターシステムの構築過程を示す模式図である。

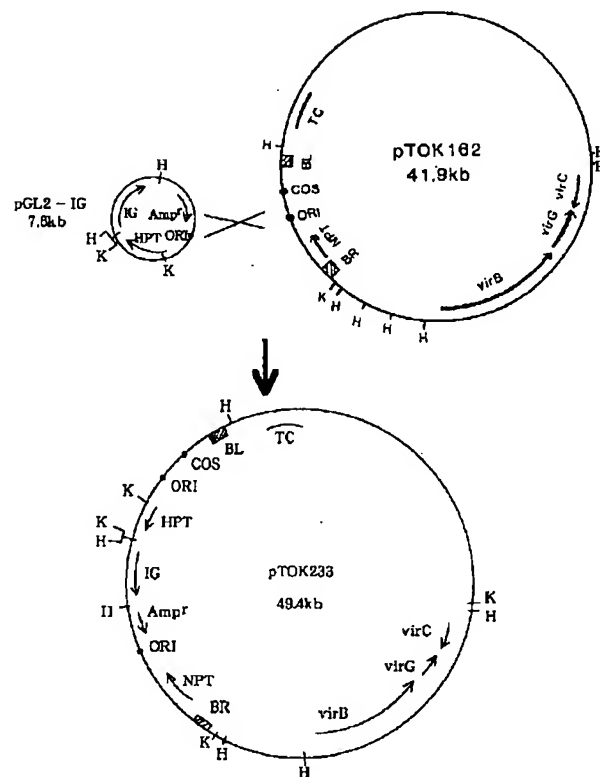
【図4】アグロバクテリウム ツメファシエンシスの強病原性菌株A281に由来する2種類のバイナリーベクターシステムを示す模式図である。

【符号の説明】

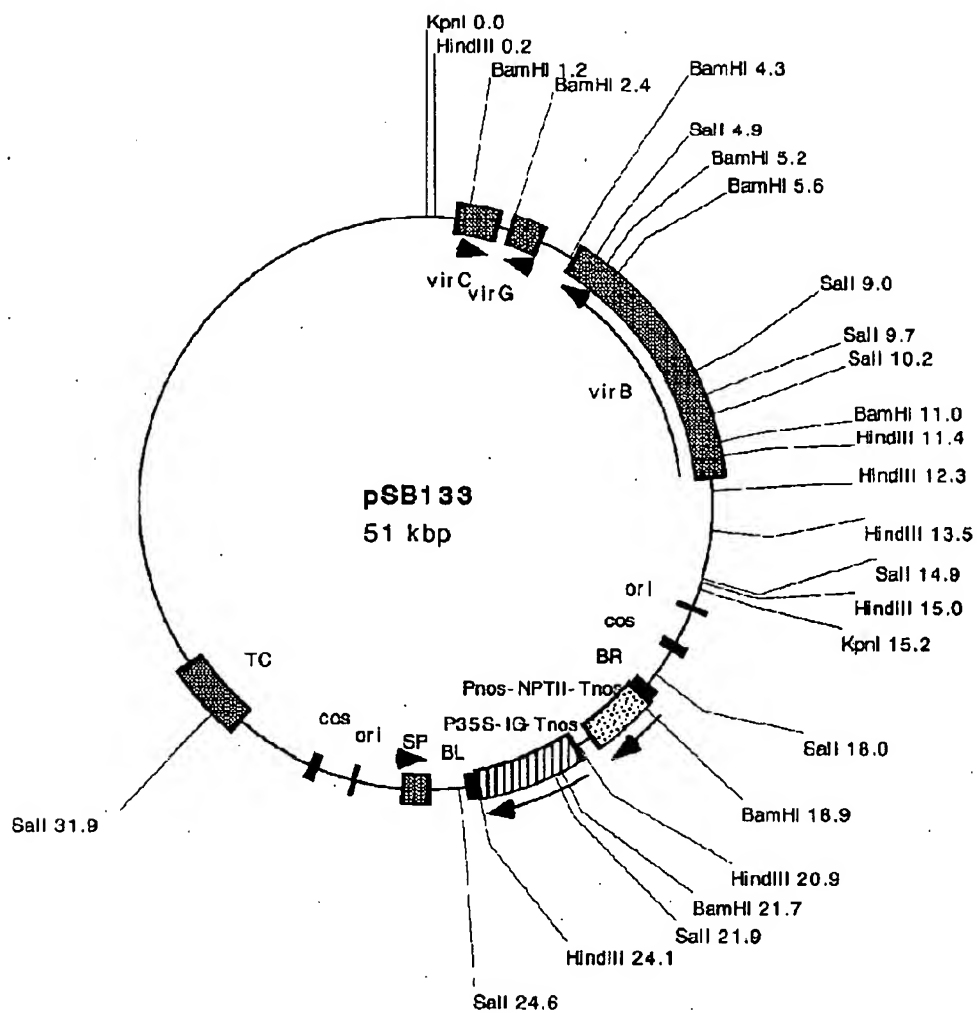
virB *Agrobacterium tumefaciens* A281に含まれるTiプラスミドpTiBo542のヴィルレンス領域中のvirB遺伝子  
 virC *Agrobacterium tumefaciens* A281に含まれるTiプラスミドpTiBo542のヴィルレンス領域中のvirC遺伝子  
 virG *Agrobacterium tumefaciens* A281に含まれるTiプラスミドpTiBo542のヴィルレンス領域中のvirG遺伝子  
 BL アグロバクテリウム属細菌のT-DNAの左ボーダー配列  
 BR アグロバクテリウム属細菌のT-DNAの右ボーダー配列  
 TC テトラサイクリン抵抗性遺伝子  
 SP スペクチノマイシン抵抗性遺伝子

IG イントロンGUS遺伝子  
 HPT ハイグロマイシン抵抗性遺伝子  
 K 制限酵素KpnI部位  
 H 制限酵素HindIII部位  
 Ampr アンピシリン耐性遺伝子  
 BAR bar遺伝子  
 Pnos ノパリン合成酵素遺伝子のプロモーター  
 Tnos ノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター  
 P35S CaMV 35Sプロモーター  
 COS, cos ラムダファージのCOS部位  
 ORI, ori ColE1の複製開始点  
 NPT, NPTII カナマイシン抵抗性遺伝子  
 Vir アグロバクテリウム属細菌のTiプラスミドの全vir領域  
 S Vir 強病原性アグロバクテリウム属細菌のTiプラスミドpTiBo542の全vir領域  
 s vir\* TiプラスミドpTiBo542のvir領域の一部を含む断片

【図1】

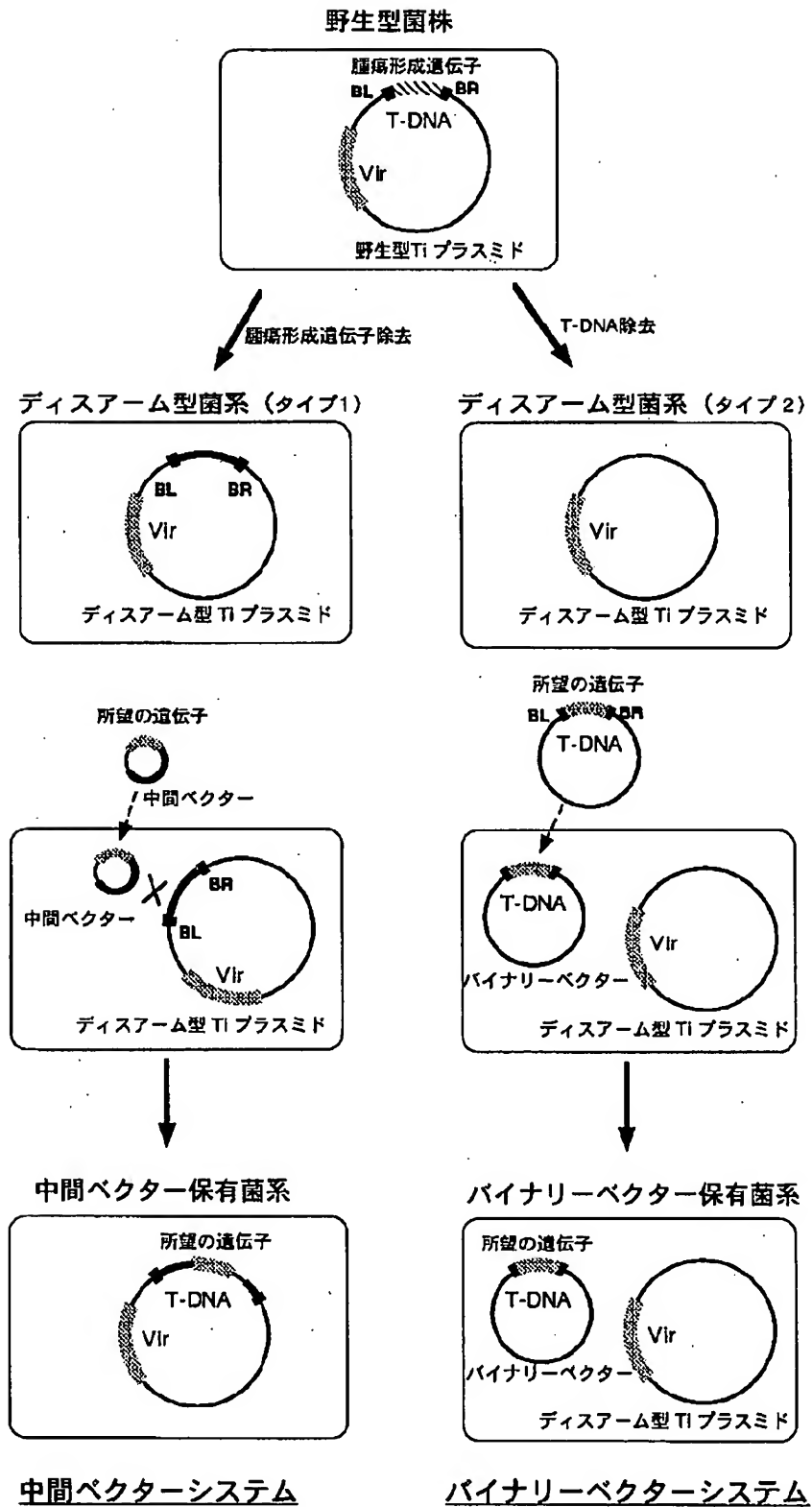


【図2】

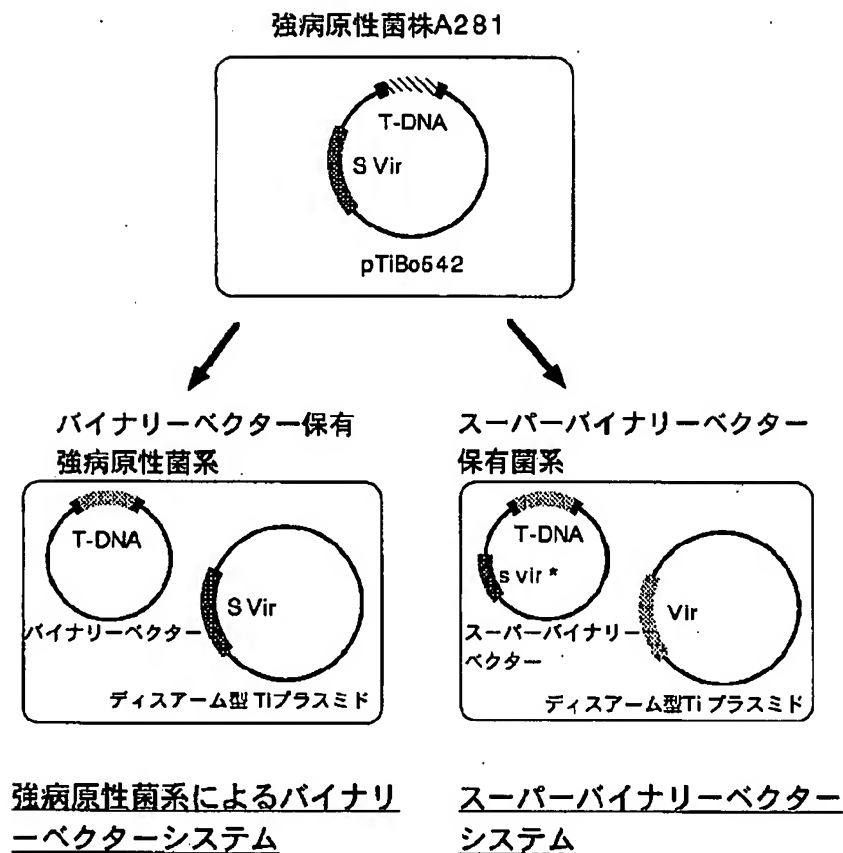




【図3】



【図4】



フロントページの続き

(72)発明者 石田 祐二  
静岡県磐田郡豊田町東原700番地 日本た  
ばこ産業株式会社遺伝育種研究所内

Fターム(参考) 2B030 AA02 AB03 AD20 CA06 CA17  
CA19 CB02 CD03 CD07 CD09  
CD13 CD17  
4B024 AA20 BA12 CA04 DA01 EA10  
FA10 GA17 GA25 HA20  
4B065 AA11X AA89X AB01 AB03  
AC10 BA25 BC50 CA31 CA60